Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen
Abteilung Immungenetik
Direktor: Professor Dr. Jan Klein

H-2 Komplex- und t-Komplex der Maus: Polymorphismus des A_β Gens von t-Chromosomen aus Wildmauspopulationen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
RALF SCHÖPFER
aus Stuttgart

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543928_0117

Aus dem Max-Planck-Institut für Biologie in Tübingen
Abteilung Immungenetik
Direktor: Professor Dr. Jan Klein

H-2 Komplex- und t-Komplex der Maus: Polymorphismus des A_β Gens von t-Chromosomen aus Wildmauspopulationen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
(Klinische Medizin)
der Eberhard-Karls-Universität
Tübingen

vorgelegt von
RALF SCHÖPFER
aus Stuttgart

1986

Dekan: Professor Dr. W. Schulte
1. Berichterstatter: Privatdozentin Dr. C. Müller
2. Berichterstatter: Professor Dr. Jan Klein

Druck: Zeeb-Druck, Tübingen 7 (Hagelloch)

Vorwort

Die vorliegende Arbeit wurde 1985 am Tübinger Max-Planck-Institut für Biologie, Abteilung Immungenetik, unter der Leitung von Prof. Jan Klein, dem ich für die Überlassung des Themas dankbar bin, durchgeführt.

Dr. Mladen Golubic und Dr. Zlatko Dembic haben mir freundlicherweise den Cosmidklon 2.1 überlassen. Danken möchte ich auch Dr. Ozren Budimir für die Erlaubnis, seine Sequenzdaten der A_{β}^{w37} und ^{w57} Gene zu verwenden.

Die DNA Probe für das A_{β} Gen wurde von Dr. L. Hood zur Verfügung gestellt.

Unersetzliche Hilfestellung bei technischen Problemen gab mir Dipl. biochem. Werner Mayer, der auch wertvolle Anregungen und Hinweise zur Bearbeitung des Themas beitrug.

Dr. Isolde Riede wies mich in die Grundzüge des DNA Sequenzierens ein.

Dr. Schwarz half mir bei der Anfertigung von Photographien.

Allen Freunden und Bekannten, die mich während dieser Zeit ertragen haben, möchte ich meinen Dank aussprechen.

Tübingen, den 22. Dezember 1985

Ralf Schöpfer

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
   1.1 Der MHC - Ein Labyrinth zu seinem Verständnis 1
   1.2 HLA und H-2 2
   1.3 Die Stuktur des MHC's aus heutiger Sicht 2
   1.4 Der t-Komplex 5
   1.5 H-2 Polymorphismus und t-Komplex 6

2. Material und Methoden 8
   2.1 Allgemeines 8
   2.2 Reagenzien und Geräte 8
   2.3 Puffer und Medien 9
   2.4 Plasmid DNA und Cosmid DNA Isolierung 9
   2.5 Bestimmung der DNA Konzentration 10
   2.6 DNA Verdau durch Restriktionsenzyme 11
   2.7 Agarosegel-Elekrophorese 11
   2.8 Southern Transfer 12
   2.9 Radioaktive Markierung von DNA durch Nicktranslation 12
   2.10 Probe für das A_β Gen 12
   2.11 Hybridisierung von Nitrocellulose-Filter 12
   2.12 Autoradiographie 13
   2.13 Subklonierung eines EcoRI Fragmentes 13
   2.14 Gezielte Deletionssubklonierung mit Restriktionsenzym 13
   2.15 Deletionssubklonierung mit Hilfe von DNAseI 14
   2.16 Transformation von E.coli 16
   2.17 DNA Sequenzierung 16
   2.18 Auswertung der Sequenzdaten 18

3. Ergebnisse 19
   3.1 Vorbemerkungen 19
   3.2 Identifizierung eines EcoRI Fragments mit dem A_β Gen 19
   3.3 Der Vektor pUC8/EcoRI/dephosphoryliert 20
   3.4 Die Plasmide E1 und E2 20

3.5 Restriktionskarte von E1 21
3.6 Deletionsklone durch SmaI Verdau 22
3.7 Deletionssubklone durch DNAseI Behandlung 23
3.8 DNA Sequenzierung 25
3.9 Die Sequenz von A_β^{w2} 25

4. Diskussion 32
4.1 Allgemeines 32
4.2 Strategie der DNA Sequenzierung 32
4.3 Die Sequenz A_β^{w2} und Polymorphismus der A_β Allele 33

5. Zusammenfassung 38

6. Literatur 39

Abbildungen und Tabellen

Abb. 1: Struktur der MHC Proteine 3
Abb. 2: Klasse II Gene des H-2 4
Abb. 3: Deletionssubklonierung mit DNAseI 14
Abb. 4: Southern Blot von Restriktionsfragmenten der Cosmid DNA 2.1 20
Abb. 5: Restriktionskarte des Plasmids E1 21
Abb. 6: Die Ableitung der Plasmide E1/Sma aus E1 und E2/Sma aus E2 22
Abb. 7: Titration der Menge an DNAseI 23
Abb. 8: Deletionssubklone 24
Abb. 9: Lage der Deletionssubklone mit jeweils sequenziertem DNA Abschnitt 26

Tab. 1: Nukleotidsequenzen von Exon 2 27
Tab. 2: Nukleotidsequenzen des Introns 28
Tab. 3: Nukleotidsequenzen von Exon 3 30
Tab. 4: Nukleotid- und Aminosäuresubstitutionen der Exone 2 und 3 31

1. Einleitung

1.1 Der MHC - Ein Labyrinth zu seinem Verständnis

Wenn man Immunologie als Wissenschaft der selbst-fremd Unterscheidung von individuellen Organismen versteht, nimmt der MHC (Haupthistokompatibilitätkomplex) eine zentrale Stellung ein.

Gorer (Gorer 1936a, Gorer 1936b) entdeckte die erste Seite des MHC's als ernach Blutgruppenantigenen auf Mäuseerythrozyten suchte: Durch Antiseren konnte er 4 Erythrozytenantigene, von ihm I-IV benannt, unterscheiden. Das Alloantigen II zeigte sich bei der Abstoßung von Tumorgewebe (Gorer 1937) und von normalem allogenem Gewebe (Medawar 1944) von Bedeutung. Diese zweite Seite des MHC's stand für die nächsten 20 Jahre in Vordergrund. Antigen II war das erste beschriebe Histokompatibilitätsantigen und der kodierende Genlocus wurde, logisch nicht ganz richtig, H-2 (Maus) benannt (Gorer et al. 1948).

In den sechziger Jahren wurde der MHC um eine Dimension erweitert: Die Stärke der Antikörperbildung auf bestimmte synthetische Oligopeptide wird von einem Gen, damals Immuneresponse Gen (Ir) genannt, bestimmt. Dieses Gen wurde im H-2 Komplex lokalisiert, war aber von den bekannten Transplantationsgenen verschieden (McDevitt et al. 1972).

Die Entdeckung der MHC Restriktion (Zinkernagel und Doherty 1974) bei der Interaktion von Zellen des Immunsystems und die Aufklärung der Struktur des T-Zell Rezeptors (Zusammenfassung siehe Kronenberg et al. 1986) haben zentrale Bedeutung für ein Verständnis der Funktionen des MHC's.

Die Struktur des Chromosomenabschnittes mit dem MHC erwies sich als noch komplexer, als man Gene für Komponenten des Komplements und für Enzyme zwischen den Genen der MHC Moleküle fand.

Und schließlich wurden mit rekombinanter DNA

Technologie innerhalb des MHC's eine Anzahl von Genen und Pseudogenen, die ausgeprägte Homologie zu den bekannten MHC Genen zeigen, gefunden, ohne daß deren Funktion bekannt ist (Hood et al. 1983). (Gesamtdarstellungen des MHC's bei Klein 1975 und 1986a)

1.2 HLA und H-2

Als man beim Menschen nach Blutgruppen/Alloantigenen der Lymphozyten suchte, wurde von Dausset (Dausset 1958) ein 'human lymphocyte antigene' (HLA) -wie es heute benannt wird- beschrieben.

Weitere Daten ergaben, daß das HLA System der MHC des Menschen ist. HLA- und H-2 Proteine haben die gleiche Struktur. Die Gene und Pseudogene sind homolog, differieren nur etwas in ihrer Anzahl und Anordung. Die beiden Systeme entsprechen sich in ihren Funktionen.

Die grundlegenden Erkenntnisse über den MHC wurden zuerst mit Hilfe kongener Mausstämme (Snell 1948) im H-2 System gewonnen und konnten dann auf das HLA System übertragen werden.

Das HLA System hat fundamentale klinische Bedeutung in der Transplantationsmedizin und kommt in der Diagnostik einiger Krankheiten wegen Kopplung bestimmter Allele mit einem Syndrom, wie z.B. HLA B27 und Morbus Bechterew, zur Anwendung.

Bis heute ist ein MHC bei etwa 20 Spezies (Säuger, Vögel, Amphibien) bekannt (Klein 1986a).

1.3 Die Struktur des MHC's aus heutiger Sicht

Der MHC kodiert für zwei Glykoproteinklassen (Abb.1):

Klasse I beinhaltet die füheren, von Snell (Gorer et al. 1948) beschriebenen Transplantationsantigene. Klasse II ,

die ebenfalls als Transplantationsantigene wirken, sind die früheren Ir-Proteine.

Heute werden beide Molekülklassen hauptsächlich als Restriktionselemente mit unterschiedlicher Struktur für T-Zell Wechselwirkungen betrachtet (Klein et al. 1981).

Komplementproteine und sonstige Enzyme, deren Gene innerhalb des MHC Chromosomenabschnittes liegen, werden nicht zum MHC gerechnet (Klein et al. 1983a).

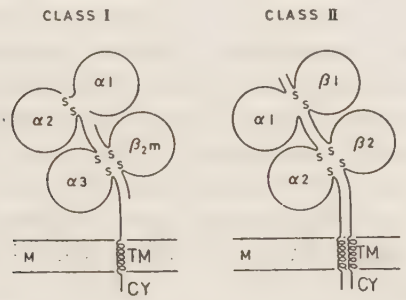


Abb. 1: Struktur der MHC Proteine
α1-3 und ß1-2 bezeichnen die extrazellulären Proteindomänen der MHC Proteine. TM: Transmembranregion. CY: Cytoplasmatische Sequenz. $ß_2m$: beta2 Mikroglobulin S S: Disulfidbrüchen. Modifiziert nach Klein et al. 1983a

Klasse I und II Moleküle können aufgrund von Strukturhomologien zusammen mit dem beta2 Mikroglobulin, den Immunglobulinen und dem T-Zell Rezeptor zu einer Supergenfamilie zusammengefaßt werden (Hood et al. 1985). Zur weiteren Struktur von Klasse I Proteinen und Genen siehe Hood (Hood et al. 1983) und Klein (Klein 1986a).

Klasse II Proteine werden als αß-Heterodimer hauptsächlich auf Makrophagen und B-Lymphozyten exprimiert. Als Glykoproteine sind die α-Ketten mit ca. 34kD (230 Aminosäuren) schwerer als die ß-Ketten (ca. 28kD, 220 Aminosäuren), während die Proteinketten ungefähr gleich lang sind. Jede Kette hat zwei extrazelluläre Domänen (α1,α2 bzw

ß1,ß2) und ist über eine hydrophobe Transmembranregion (TM) mit einem Cytoplasmatischen Teil (Cy) verbunden.

Auf DNA Ebene findet sich eine analoge Segmentierung in entsprechende Exons mit fast identischen Grenzen wieder. Zusätzlich ist immer ein Exon (Exon 1) für ein später abgespaltetes Signalpeptid vorhanden. Die Anzahl der Exone für den TM/Cy Bereich und für eine nicht translatierte Sequenz differiert bei verschiedenen Subklassen der Klasse II Gene.

Bisher wurden im HLA System 13 Klasse II Gene (6α und 7ß) in vier Blöcken beschrieben. Im H-2 Komplex befinden sich die 7 bekannten Gene in bekannter Anordnung auf einen etwa 270kb langen DNA Segment, Abb. 2 (Steinmetz et al. 1982, Davis et al. 1984, Larhammer et al. 1983, Widera und Flavell 1985). Die H-2 Gene sind homolog zu den HLA Genen.

Proteine des H-2 sind bisher nur vom $A_{ß1}$ (auch $A_ß$ genannt), $A_α$, $E_{ß1}$ ($E_ß$) und $E_α$ bekannt und bilden als $A_{αß}$ und $E_{αß}$ Heterodimere die bekannten Klasse II Antigene. Übersicht bei Klein (1986a).

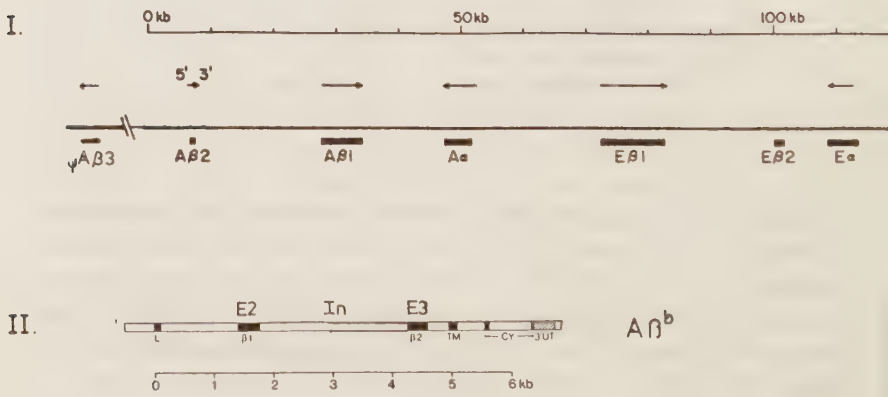


Abb. 2: Klasse II Gene des H-2

I. Anordung der Gene $A_{α,ß1,ß2,ß3}$ und $E_{α,ß1,ß2}$. Die 5'-3' Orientierung ist markiert. (modifiziert nach Widera und Flavell 1985)

II. Exon- Intron-Struktur des $A_ß$ Gens. L: Exon des Signalpeptids, E2 (3): Exon 2 (3); entsprechend der ß1 (ß2) Dömäne. In: Intron zwischen E2 und E3. TM: Exon der Transmenbranregion. CY: Exon der cytoplasmatische Sequenz. 3'UT: nicht translatierte Sequenz.

1.4 Der t-Komplex

Auf dem Chromosom 17 der Maus befindet sich zwischen dem Zentromer und dem H-2 Komplex der t-Komplex. Vollständige t-Chromosomen zeigen im Unterschied zu nicht-t-Chromosomen (+-Chromosomen) folgende Merkmale (Klein 1986a):

I. t-Chromosomen können durch ihre Interaktion mit dem dominanten T-Locus (Chromosom 17) erkannt werden: Mäuse mit T/+ haben einen kurzen Schwanz, während T/t Mäuse schwanzlos sind. T/T ist lethal; t/+ hat einen normalen Phänotyp (Dobrovolskaia-Zavadskaia und Kobozieff 1932).

II. t-Chromosomen zeigen Segregationsdistorsion (Chesley und Dunn 1936): 90-100% der Nachkommen von t/+ Männchen mit +/+ Weibchen sind vom t/+ Genotyp. Ein vergleichbares System ist bei Drosophila beschrieben (Sandler und Golic 1985).

III. t-Chromosomen sind in ihrer Rekombination mit +-Chromosomen vom Zentromer bis einschließlich dem H-2 supprimiert. Bei heterozygoten t^x/t^y findet sich diese Supression nicht (Silver und Artzt 1981).

IV. Homozygote t^x/t^x Embryos sterben in utero zu einem für einen bestimmten t-Haplotyp charakteristischen Zeitpunkt. Per Definition haben lebensfähige t^x/t^y Mäuse zwei verschiedene t-Haplotypen. Inkomplette t-Haplotypen können t^x/t^x semiletal oder vereinzelt auch lebensfähig sein (Bennett 1975). t^x/t^y Männchen sind unfruchtbar (Bryson 1944).

V. t-Chromosomen wurden mit Ausnahme weniger Inselpopulationen in allen bisher untersuchten Mauspopulationen der Welt gefunden (Sturm et al. 1982).

Über die Proteine und Gene des t-Komplexes ist wenig bekannt. Silver und Mitarbeiter (Silver et al. 1983) fanden im Mäusetestis mehrere t-Komplex-Proteine (Tcp), die sich jeweils in ihrem Isoelektrischen Punkt von dem entsprechenden Protein des +-Haplotyps unterscheiden. Tcp1 wurde kürzlich kloniert (Willison et al. 1986).

Mit Hilfe der Mikroklonierung des Chromosoms 17 wurden einige t-spezifische DNA Fragmente erhalten (Röhme et al. 1984).

Eine oder mehrere Inversionen, die wahrschein ein Grund für die Rekombinationssuppression sind, wurden für t-Chromosomen beschrieben (Artzt et al. 1982).

1.5 H-2 Polymorphismus und t-Komplex

Nach serologischen Daten zeigen Proteine des MHC's im Gegensatz zu anderen Proteinen einen ausgeprägten Polymorphismus (Klein und Figueroa 1981).

'Peptidemapping' und Proteinsequenzierung konnten den Polymorphismus der Klasse II Proteine hauptsächlich der ß1- und in geringerem Ausmaß der α1-Domäne zuordnen.

Erste serologische Studien zum Polymorphismus von H-2 Antigenen auf t-Chromosomen, die aus nordamerikanischen Mäusepopulationen extrahiert worden waren, fanden nur wenige -und auf +-Chromosomen nicht vorhandene- H-2 Haplotypen (Hammerberg und Klein 1975), die damit als exzellenter Marker für t-Chromosomen galten.

Nach Extraktion von t-Chromosomen von verschiedenen Gebieten der Welt (Klein et al. 1982) sind in der Zwischenzeit mindestens 16 verschiedene t-Chromosomen bekannt.

Ausgiebige serologische Studien der Klasse I und II Antigene (Sturm et al. 1982, Nizetic et al. 1984), Untersuchungen zum Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus der Klasse II Loci (Figueroa et al. 1985) und der Komponente 4 des Komplements (Golubic et al. 1985) sowie Sequenzanalysen des E_α Genes (Dembic et al. 1985) dieser t-Chromosomen wurden duchgeführt. Die Bildung von drei Gruppen von t-Chromosomen war mit allen Daten konsistent, ohne daß jedoch direkte Beziehungen zwischen diesen Gruppen hergestellt werden konnten.

Diese drei Gruppen lassen verschiedene zwei Hypothesen zu:

I. Jede Gruppe stammt von je einem Ur-t-Chromosom ab.

t-Chromosomen sind also mindestens dreimal unabhängig voneinander entstanden.

II. Alle t-Chromosomen leiten sich von einem Ur-t-Chromosom ab und sind durch Evolution in mindestens drei Gruppen divergiert.

Die Hypothese II wird durch die Daten von Lehrach und Mitarbeitern (Röhme et al. 1984) gestützt: Die untersuchten t-Haplotypen zeigten in Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusstudien mit ihren t-spezifischen DNA Proben ein einheitliches Bild, das von den nicht-t-Haplotypen differierte.

Das folgende Modell kann für t-Chromosomen auf Grund ihrer Eigenschaften diskutiert werden: Segregationsdistorsion eines Chromosoms führte zum Selektionsvorteil, Letalfaktoren, die zusätzlich erhalten wurden, verhindern die Elimination der anderen Chromosomen und durch Rekombinationssuppression wird dieses System stabilisiert.

Wir erhofften uns, aus den Sequenzen eines A_{β} Allels aus jeder dieser Gruppen detaillierte Beziehungen dieser A_{β} Allele und damit der t-Haplotypen zueinander zu erhalten. Das Ziel war, insbesondere die Sequenzen der ß1 Domäne (Exon 2) und Teile des Introns zwischen ß1 und ß2 zu vergleichen.

In der vorliegenden Arbeit wird die Sequenzierung von 3kb des A_{β}^{w2} Allels (Stamm EDY 589, Orkney Inseln, Klein et al. 1982) und der Vergleich mit den A_{β}^{w57} (CRO 437, Gizza Governate, Ägypten), A_{β}^{w37} (CRO 435, Gizza Governate, Ägypten), A_{β}^{b}, A_{β}^{d}, A_{β}^{k} beschrieben.

2. Material und Methoden

2.1 Allgemeines

Sofern nicht besonders angegeben, wurden die Versuchsprotokolle von Maniatis (Maniatis et al. 1982) angewandt. Es wurde ausschließlich zweifach destilliertes Wasser verwendet. Lösungen wurden, sofern möglich, autoklaviert oder, falls notwendig, steril filtriert.

2.2 Reagenzien und Geräte

Restriktionsenzyme wurden von Pharmacia oder Boehringer bezogen; Klenow Fragment, alkalische Phosphatase aus Kälberdarm (CIP) und Nukleotide waren von Boehringer.

Die Enzyme T4 Ligase und T4 Kinase, die Ultrapur Reagenzien Agarose, 'low melting point' Agarose, Tris (Trishydroxymethylaminomethan), Sucrose, Cäsiumchlorid ($CsCl_2$), Acrylamid, Bisacrylamid und Harnstoff wurden von BRL gekauft.

Weitere Chemikalien (pro analysi) und Lösungsmittel (pro analysi) lieferte Merck. Agar, Yeast Extrakt und Bactotryptone für Medien waren von Difco.

Von NEN wurde α32PdCTP, α und γ 32PdATP bezogen.

Zur horizontalen Agarosegel-Elektophorese wurden die BRL Systeme H4 (20cm x 25cm) und H6 (5,0cm x 7,5cm) verwendet. Für Sequenziergele wurde das BRL System S0 (34cm x 40cm) benutzt.

Die Zentrifugen waren unter anderem von Sorvall (RC2-B) mit den Rotoren SS34, GS3 und HB4. Die Ultrazentrifugen waren von Beckman und Kontron mit den Rotoren Ti50, Ti60 und VTi50.

Das verwendete ultraviolette (UV) Licht hatte eine Wellenlänge von 366nm.

2.3 Puffer und Medien

LB-Medium pH7,5:	10g	Bactotryptone
	5g	Yeast Extract
	10g	NaCl
	550µl	10N NaOH
	1l	Wasser
SSC-Lösung:	150mM	NaCl
	15mM	Na-citrat
TE-Puffer:	10mM	Tris HCl pH8,0
	1mM	EDTA (Ethylendinitrilotetra-essigsäure)
Ligations-Puffer:	60mM	Tris HCl pH7,6
(LP)	10mM	$MgCl_2$
	1mM	DTT (Dithiotreit)

2.4 Plasmid DNA und Cosmid DNA Isolierung

Das Plasmid pUC8 (Vieira und Messing 1982) und das Cosmid pNNL (Grosveld et al. 1982) tragen mit und ohne Insert Resistenz gegen Ampicillin.

Zur Gewinnung von extrachromosomaler DNA wurden 5ml Vorkultur (LB-Medium mit 50µg/ml Ampicillin) des betreffenden Bakterienstammes mindestens 5 Stunden (37°C) hochgezogen. Diese Vorkultur wurde dann in 200 bis 800ml LB (mit 50µl/ml Ampicillin, 10µg/ml Thiamin, 0,4% Glucose) gegeben und über Nacht kräftig geschüttelt (37°C).

Die weitere Prozedur wurde bei 0°C durchgeführt. Die Bakterien wurden 10min bei 6000rpm (GS 3) pelletiert, das Pellet in 50ml TSE (50mM Tris HCl, 50mM NaCl, 5mM EDTA, pH8,0) suspendiert, 10min bei 3000g zentifugiert. Die weitere Aufarbeitung der Bakterien erfolgte nach der 'cleared lysate' Methode (modifiziert nach Messing 1983):

pro 100ml Ausgangskultur wurde zuerst das Pellet in

2,2ml TS (25% Sucrose, 50mM Tris HCl, pH 8,0) vollständig suspendiert, dann 0,5ml Lysozymlösung (10mg/ml in TS) zugegeben. Nach 10min erfolgte die Zugabe von 0,25ml 0,5M EDTA mit 200µg/ml RNAse A, nach weiteren 10min die Zugabe von 1,9ml 10% Triton in 50mM EDTA, 50mM Tris HCl, pH8,0.

Das Lysat wurde nach 10-20min für 30min bei 35.000rpm im Ti50/60 zentrifugiert. Der klare Überstand, der die Plasmid/Cosmid DNA enthält wurde durch Cäsiumchlorid/EtBr (Ethidiumbromid) Gleichgewichtsgradientenzentrifugation weiter gereinigt: pro ml Überstand wurden 1,06g $CsCl_2$ und nach 30min wurde zur klaren Unterphase (mach 30min) 60µl EtBr Lösung (10mg/ml) zugegeben.

Die Zentrifugation erfolgte bei 43.000rpm für 44h im Ti 50/60 oder für 20h im VTi 50 Rotor, jeweils bei 20°C.

Die im UV-Licht sichbare untere Bande wurde abgenommen und entweder noch einmal über Cäsiumchlorid/EtBr Gradienten gereinigt oder sofort mit 1 Vol. (Volumen) Isoamyakohol dreimal extrahiert, mindestens 2h gegen TE dialysiert, dann zweimal mit Phenol, einmal mit Chloroform und zweimal mit Ether extrahiert. Die DNA wurde mit Ethanol präzipitiert, je einmal mit 96%, 80%, 70% Ethanol gewaschen, 10 min im Vakuum getrocknet und in TE aufgenommen.

Miniprep DNA wurde aus 1,5ml Kulturen durch alkalische Lyse (Birmboim 1983) isoliert.

2.5 Bestimmung der DNA Konzentration

Da die so gereinigte DNA (vergl. 2.4, keine Miniprep DNA) frei von Proteinen war, konnte die Konzentration durch OD_{254} (optische Dichte) Messung bestimmt werden. 1 OD entspricht 50µl/ml DNA.

Geringe DNA Kozentrationen wurden durch Auftüpfeln von 1µl DNA Lösung auf eine EtBr-haltige Agarplatte und -im Vergleich zu aufgetragenen Standardlösungen- unter UV Licht bestimmt.

2.6 DNA Verdau durch Restriktionsenzyme

Die vom Hersteller empfohlenen Reaktionbedingungen wurden angewendet. Für analytische Verdaue wurden 200-1000ng DNA in 10µl mit 2-10U Enzym für 1-2h inkubiert.

Präparativ wurden 200-300ng DNA/µl mit ca. 3U Enzym/µg DNA 1h bis über Nacht verdaut.

2.7 Agarosegel-Elektrophorese

Es wurden horizontale Agarosegele mit 0.6%-1,2% Agarose oder 'low melting point' Agarose in TAE (40mM Tris-acetat, 2mM EDTA, pH8,0) mit 1µg/ml EtBr verwendet.

Die Proben wurden mit 1/10 Vol. Auftragepuffer (25% Ficoll, 0,3% Bromphenolblau, 0,3% Xylencyanol) aufgetragen und die Trennung bei 1-3 Volt/cm (20cm x 25cm x0,4cm Gel) oder 100Volt (5cm x 7,5cm x 0,25cm Minigel) für 16h (0,5h für Minigel) durchgeführt.

Als Längenstandards kamen EcoRI (21kb, 7,4kb, 5,8kb, 5,6kb, 4,9kb und 3,5kb) und HindIII (23kb, 9,4kb, 6,6kb, 4,4kb 2,3kb und 2,0kb) verdaute Lambdaphagen DNA (Boehringer) sowie TaqI (1,4kb, o,8kb, o,4kb) und RsaI (2,0kb, 0,7kb) verdaute pUC8 DNA zur Anwendung.

Die Auswertung der Gele erfolgte durch Betrachtung bei 366nm und bei Bedarf wurde auf Polaroidlandfilm Typ 52 oder 57 dokumentiert.

Zur präparativen Elektroelution wurde die entsprechende Gelbande ausgeschnitten, im Dialyseschlauch mit 3ml 0,1xTAE in der Elektrophoresekammer 30min bei 100Volt und 30sec invertierter Spannung eluiert. Mit Hilfe von Elutip (Schleicher und Schüll) wurde die DNA affinitätschromatographisch gereinigt und auf 400µl eingeengt. Weitere Konzentration und Salzentferenung erfolgte durch Ethanolpräzipitation.

2.8 Southern Transfer

Nach der photographischen Dokumentation einer Agarosegel Elektrophorese mit Längenmaßstab wurde die DNA auf Nitrocellulose transferiert (Southern 1975). Dazu wurde das Gel nacheinander in folgende Lösungen gelegt:

15min in 0,2N HCl zur partiellen sauren Depurinisierung, 1min in Wasser, 30min in 0,5M NaOH und 1,5M NaCl zur alkalischen Denaturierung, 1min in Wasser, 30min in 0,5M Tris HCl und 3M NaCl, ph7,4 zur Neutralisierung.

Mit 20x SSC als Transferpuffer wurde die DNA mit dem Flüssigkeitsstrom auf Nitrocellulosefilter (BA 85, Schleicher und Schüll) übertragen. Nach zweistündigem Backen bei 80°C im Vakuumofen war die DNA irreversibel an die Nitrocellulose gebunden.

2.9 Radioaktive Markierung von DNA durch Nicktranslation

Zur Nicktranslation (Rigby et al. 1977) wurde der 'Nick translation reagent kit' von BRL mit α32PdCTP nach Herstellervorschrift angewendet.

2.10 Probe für das A_β Gen

Die genomische DNA für das A_β Gen war als 5,6kb EcoRI Insert in pBR325 kloniert worden (Steinmetz et al. 1982, Majissen et al. 1983). Insert DNA wurde durch Elektroelution nach präparativer Elektrophorese von EcoRI verdautem Plasmid gewonnen.

2.11 Hybridisierung von Nitrocellulose-Filter

Zunächst wurde im rotierenden Plexiglasrohr für 4h bei 42°C prähybridisiert in 50% Formamid, 4x SSC, 1x Denhard's

Lösung (0,1% Ficoll, 0,1% Polyvinypyrrolidine, 0,1% BSA), 40mM Natriumphosphatpuffer pH6,5, 10% Dextransulfat, 250µg 'salmon sperm' DNA pro ml Lösung. Unter gleichen Bedingungen wurde 16h mit zusätzlich 10^6cpm ^{32}P markierter Probe hybridisiert. Der Filter wurde je zweimal 15min mit bei 65°C mit 2x SSC und zweimal mit 0,1X SSC 65°C gewaschen (stringente Bedingungen).

2.12 Autoradiographie

Röntgenfilme (Cronex 4, Du Pont) wurden 1h bis 3 Tage in Kassetten bei -70°C exponiert. Bei Bedarf wurden Verstärkerfolien (Kodak) verwendet. Entwickelt wurde mit Kodak LX24, fixiert wurde mit Kodak AL4.

2.13 Subklonierung eines EcoRI Fragmentes

5µg Vektor pUC8 wurden mit EcoRI vollständig linearisiert und die 5' Enden wurden mit CIP dephosphoryliert.

In 10µl wurden 10ng dieser Vektor DNA mit 30ng zu klonierender DNA (EcoRI 'sticky ends') durch 1U T4 Ligase in LP mit 0,5mM ATP 4h bei 15°C ligiert. Davon wurden 5µl zur Transformation eingesetzt.

2.14 Gezielte Deletionssubklonierung mit Restriktionsenzym

Prinzip: Durch Restriktionsenzymverdau des Plasmids und anschließender Selbstligation der Enden wird ein Teil des Inserts (hier: ein SmaI Fragment zwischen der Primerbindungsstelle und β_1 Domäne) eliminiert.

Durchführung: 1µg DNA wurde in 10µl mit SmaI vollständig verdaut und nach Hitzeinaktivierung durch 10min bei 65°C über Nacht bei 15°C in 50µl LP mit 0,5mM ATP ligiert. Davon wurden 10µl zur Transformation eingesetzt.

2.15 Deletionssubklonierung mit Hilfe von DNAseI

Prinzip (Frischauf et al. 1980) vergl. Abb.3:

'supercoiled' Plasmid DNA soll durch DNAseI Behandlung, die in Anwesenheit von Mn^{2+} Ionen vorwiegend Doppelstrangbrüche katalysiert, statistisch durch genau einen Schnitt linearisiert werden. Nach Auffüllen/Abschneiden kurzer 'sticky ends' durch Klenow Polymerase wird phosphorylierter Linker stumpf anligiert. Durch entsprechenden Restriktionsenzym-Verdau (R1) wird der Linker zu 'sticky ends' aufgeschnitten. Gleichzeitig erfolgt dadurch ein Schnitt in der 'multiple cloning site' des Plasmids.

Das entstehende Gemisch von Fragmenten wird durch präparative Elektrophorese in 'low melting point' Agarose aufgetrennt. Gelfragmente, die die gewünschten DNA Längenfragmente enthalten, werden ausgeschnitten. Die DNA wird selbstligiert und zur Transformation eingesetzt.

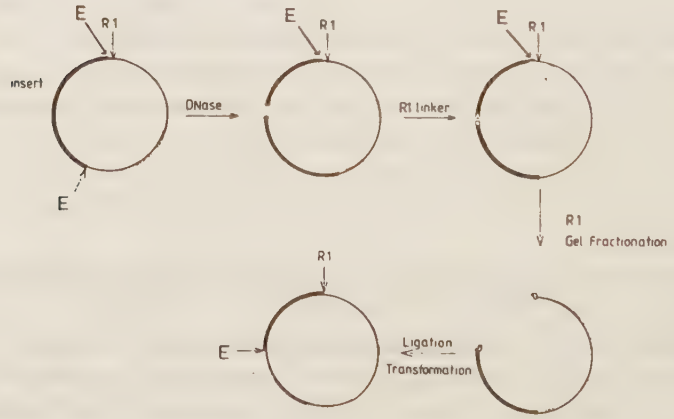


Abb. 3: Deletionssubklonierung mit DNAseI
E: EcoRI, R1: Restriktionsenzym 1.
(modifiziert nach Frischauf et al. 1980)

Durchführung:

Titration der benötigten Menge an DNAseI: In 10µl Ansätzen (A-E) in DNAseI Puffer (20mM Tris HCl, 1,5mM $MnCl_2$, pH7,6) wurden 0,5µg DNA mit A: 300pg, B: 100pg, C: 30pg, D: 10pg, E: 3pg DNAseI 20min lang bei 25°C inkubiert. Diese Reaktionen wurden durch Einstellen auf 20mM EDTA gestoppt. Durch Elektrophorese konnte die Enzymmenge, die ca. 50% der DNA als linearen Strang zeigte, ermittelt werden.

Präparativ wurden 20µg DNA in 80µl mit der 32 fachen DNAseI Menge unter gleichen Bedingungen umgesetzt. Nach Phenol-, Chloroform-, Etherextraktionen und Ethanolpräzipitation wurde in 20µl LP mit 2U Klenow Polymerase die Enden polliert, dann 10min bei 65°C inkubiert. Daran wurden 200pmol phosphorylierter Linker mit 5U T4 Ligase anligiert (in 40µl LP mit 0,5mM ATP, 12h). Nach Präzipitation wurde mit 5h in 100µl SalI Puffer mit 150U SalI verdaut. Nach stringenter Isopropanolfällung mit 11µl 3M Na-acetat pH6,0 und 64µl Isopropanol bei Raumtemperatur wurde in 100µl mit 100U SalI nachverdaut. Die DNA wurde Phenol und Chloroform-extrahiert, dann Ethanolpräzipitiert und in 80µl TE aufgenommen.

Davon wurden 40µl durch 0,6% 'low melting point' Agarose elektrophoretisch bei 4°C möglichst gut aufgetrennt. Im Bereich 2,7kb (Vektor) bis 9kb (Vektor + Insert) wurden etwa 20 Gelfragmente ausgeschnitten und jedes Gelstück wie folgt weiterbehandelt:

Durch 10 minütige Inkubation bei 65°C wurde die Agarose geschmolzen und auf 2 Vol in LP gebracht und daraufhin bei 37°C wurde mit 1U T4 Ligase und 0,5mM ATP über Nacht ligiert. Nach 1h bei 4°C wurden 800µl 0,1M $CaCl_2$ überschichtet und nach 15min wieder abgenommen. Zur festen Agarose wurden drei Vol. 0,1M $CaCl_2$ zugegeben und 10min auf 65°C erhitzt. Davon wurden 100µl zur Transformation von 200µl kompetenten Zellen verwendet.

2.16 Transformation von E.coli

Bakterienzellen MC 1061 (Casadaban und Cohen 1980) der frühen log Phase wurden mit 0,1M $CaCl_2$ kompetent gemacht (Maniatis et al. 1982) und nach 1h-24h Lagerung bei 4°C verwendet.

Die Tranformation erfolgte durch einen Hitzeschock von 2min bei 37°C.

Zur Kontrolle wurde die Ampicillinsensitivität der Zellen ohne Plasmid getestet. Die Transformationseffizenz für 'supercoiled' DNA wurde mit 10pg pUC8 bestimmt.

2.17 DNA Sequenzierung

Sequenziert wurde nach der enzymatischen Kettenabbruch-Methode durch 2'3' Didesoxynukleotide (Sanger et al. 1975, Sanger et al. 1977) auf Plasmid DNA nach Anhybridisierung eines synthetischen Oligonucleotidprimers (Wallace et al. 1981).

Die zu sequenzierende DNA wird in die 'multiple cloning site' von pUC8 kloniert und befindet sich damit 3-30 Nukleotide 'downstream' von der Hybridisierungstelle des M13 Sequenzierprimers (Vieira und Messing 1982, Messing 1983).

Die gut gereinigte Plasmid DNA wird durch ein geeignetes Restriktionsenzym linearisiert (z.B. BglI) . Durch Erhitzen auf 100°C (bei fünffachem molaren Überschuß des Primers) erfolgt Strangtrennung der DNA. Durch schnelles Abkühlen auf 0°C hybridisiert der Primer bevorzugt vor dem komplementären Strang (Wallace et al. 1981). Klenow Polymerase katalisyert die Kettenverlängerung ('puls') auf dieser geprimten DNA in Anwesenheit von Desoxynukleotiden (inclusive α32PdATP). Der spezifische Kettenabbruch erfolgt durch Einbau des entsprechenden 2'3' Didesoxynukleotides (siehe auch Kornberg 1980). Unspezifische Kettenabbrüche werden durch Zugabe eines Überschusses von Desoxynukleotiden ('chase') verlängert. Durch Formamid/EDTA wird die Reaktion

gestoppt. Das Volumen der Reaktion wird eingeengt und das Gemisch durch denaturierende Polyacrylamid-Elektrophorese (Maniatis et al. 1982) aufgetrennt.

Die Sequenzleiter kann nach Autoradiographie gelesen werden

Die Durchführung erfolgte nach einem Versuchsprotokoll von Riede (Riede 1985).

Die folgenden Nukleotidgemische wurden aus aliquotierten Stammlösungen (20mM Desoxynukleotide, 10mM Didesoxynukleotide, im Wasser) vorbereitet:

Mix1 (Mix2)

		T Mix	C Mix	G Mix	A Mix
0.5mM	dTTP	5	100	100	100
0,5mM	dCTP	100	5	100	100
0,5mM	dGTP	100	100	5	100
10mM	ddTTP	15(30)			
10mM	ddCTP		2(5)		
10mM	ddGTP			3(5)	
10mM	ddATP				2,5(1)
10mM	Tris-HCl pH8,0	200	200	200	100

Die Angaben sind alle in µl. Die Werte der Didesoxynukleotide galten für normale (lange) Gemische.

4µg Plasmid DNA wurden mit 5U BglI (Boehringer) oder EcoRI in 80µl (30µl) SP (15mM Tris HCl, 6mM $MgCl_2$, 1mM DTT, 50mM NaCl, pH7,8) linearisiert. Davon wurden 5µl mit 5µl Primer (New England Biolabs Nr. 403-2, 15mer oder 1201, 17mer) 2,5ng/µl (oder mit 3µl Primer 5ng/µl und 2µl 3x SP) in eine 10µl Kapillare eingeschmolzen und 5min lang im Wasserbad gekocht. Zur schnellen Abkühlung wurde die Kapillare dann direkt 5min im Eiswasser abgekühlt. Von deren Inhalt wurden jeweils 2µl zu je 2µl der vier verschiedenen Nukleotid-Ge-

mische gegeben.

Durch je 2µl 'go'-Mix (je Klon: 7µl Wasser, 0,3µl Klenow Polymerase 5U/µl, 1µl α32PdATP 800Ci/mmol 10µCi/µl) wurden die Reaktionen gestartet. Nach 15min wurde zu jeder Reaktion 2µl 'chase' Mix (alle dNTP 250µM) gegeben und die Reaktionen nach weiteren 15min mit je 4ul Stop Puffer (95% Formamid, 20mM EDTA, 0,3% Bromphenolblau, 0,3% Xylencyanol) gestoppt.

Jede Reaktion wurde für zwei Gelläufe aufgeteilt und durch 10min im 'speed vac' durch Entfernen des Wassers eingeengt. Die Proben wurden kurz vor Beladen des Gels 3min im Wasserbad gekocht und dann im Eiswasser abgekühlt. Das Gesamtvolumen wurde mit einer Kapillare auf vorgrwärmte 6% oder 8% Polyacrylamidgele (34cm x 40cm x 0,4mm, 8M Harnstoff enthaltend) aufgetragen und 1,5-9h bei 60W elektrophoretisch aufgetrennt.

Nach Autoradiographie von 16-36h ohne Verstärkerfolien wurden die Röntgenfilme entwickelt.

Sofern eine bessere Auflösung der Banden erwünscht war, wurden die Gele nach der Elektrophorese in 10% Essigsäure, 20% Ethanol für 15min fixiert, dann 5min gewässert und auf Filterpapier unter Vakuum bei 80^{o}C getrocknet.

2.18 Auswertung der Sequenzdaten

Die abgelesen Sequenzdaten wurden auf einem PDP 11 Computer und den Programmen 'BATIN, SEARCH, SEQFIT, SEQLST' (Staden 1977) weiterverarbeitet.

3. Ergebnisse

3.1 Vorbemerkungen

Der Cosmid Klon 2.1 war bei der Analyse einer homozygoten genomischem Cosmidbibliothek des semiletalen Mausstammes EDY 589 von M. Golubic und Z.Dembic (Golubic 1985) als positiv für das A_β Gen identifiziert worden.

3.1 Identifizierung eines EcoRI Fragmentes mit dem A_β Gen

DNA 2.1 wurde mit Restriktionsenzymen einfach und doppelt verdaut. Die Verdaue mit MluI, NruI und SalI zeigten jeweils nur ein Fragment. Dies ist inkompatibel mit den bekannten Schnittstellen (jeweils zwei) im verwendeten pNNL Vektor, so daß eine Deletion von Vektorsequenzen über mehrere kb angenommen werden muß.

Im 'Southern blot' mit dem A_β Gen als Probe wurden diejenigen Restiktionsenzymfragmente, die das A_β Gen zumindest teilweise enthielten, identifiziert (Abb.4). Ein 6,2 kb EcoRI Fragment

I. war als einzige EcoRI Bande positiv;
II. hatte keine MluI, NruI und KpnI Schnittstelle und enthält damit wahrscheinlich nur Insert DNA und keine Vektoranteile;
III. hatte die gleiche Größe wie das einzige entsprechende EcoRI Fragment im genomischen Southern Blot (Golubic 1985).

Dieses Fragment enthielt also das gesamte A_β Gen und wurde in pUC8 subkloniert.

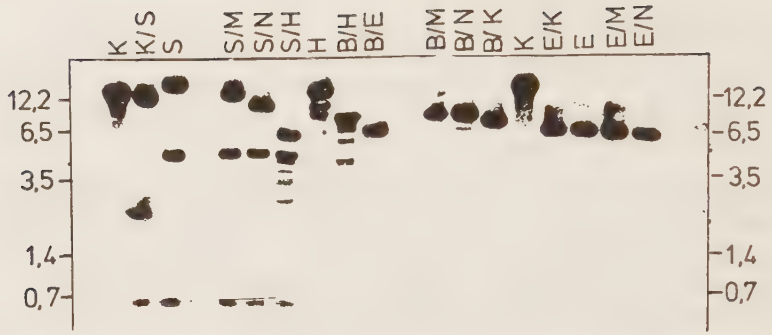


Abb. 4: Southern Blot von Restriktionsfragmenten der Cosmid DNA 2.1 Einfach- und Doppel-Verdaue mit den angegebenen Restriktionsenzymen; B: BstEII, E: EcoRI, H: HpaI, K: KpnI, M: MluI, N:NruI S: SmaI. Längenmaßstab in kb

3.3 Der Vektor pUC8/EcoRI/dephosphoryliert

Aus 800ml-LB Medium konnten nach zwei $CsCl_2$/EtBr Zentrifugationsläufen 600µg pUC8 DNA gewonnen werden. 5µg wurden mit EcoRI verdaut und die Enden dephosphoryliert (pUC8/E/d). Der Vektor wurde wie folgt getestet:

I. Die Transformation mit 10ng pUC8/E/d ergaben fünf ampicillinresistente Kolonien.

II. Die Transformation mit 1ng pUC8/E/d nach versuchter Selbstligation ergab keine ampicillinresistente Kolonie.

Die Linearisierung des Vektors und Dephosphorylierung der Enden waren also ausreichend.

3.4 Die Plasmide E1 und E2

10µg DNA 2.1 wurden präparativ mit EcoRI verdaut und elektrophoretisch aufgetrennt. Die 6,2kb Bande wurde elektroeluiert.

Nach Ligation in pUC8/E/d wurden MC 1061 Bakterien transformiert und etwa 100 Kolonien erhalten. Die Trans-

formationseffizienz betrug in den duchgeführten Versuchen $2x10^5$ bis $5x10^7$. Von vier Kolonien wurde Miniprep DNA isoliert und jeweils mit EcoRI und HindIII verdaut:

I. Alle vier Klone enthielten das 6,2kb EcoRI Fragment.

II. Im HindIII Verdau zeigten E2, E3, E4 die gleichen Fragmente, welche von den E1 Fragmenten differierten.

E2, E3, E4 einerseits und E1 andererseits enthalten also das Insert in entgegengesetzter Orientierung.

3.5 Restriktionskarte von E1

Für die Restrikionsenzyme BstEII, ClaI, KpnI, MluI, NruI, SalI und XhoI hatte E1 keine Schnittstellen.

Die Kartierung für BamHI, BglI, EcoRI, HindIII und SmaI ist aus Abb.5 ersichtlich.

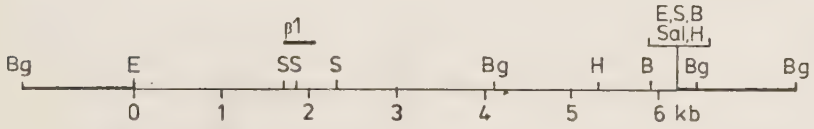


Abb.5 Restriktionskarte des Plasmids E1
Bg:BglI, E:EcoRI, S:SmaI, H:HindIII, B:BamHI, Sal:SalI
—— Vektor, —— Insert
ß1: beta 1 Domäne des A_β Gens

3.6 Deletionsklone durch SmaI Verdau

Von E1 und E2 wurden mit SmaI Deletionsklone hergestellt (Abb.6). Jeder Transformationsansatz führte zu etwa 200 Kolonien. Je drei Kolonien wurden durch Restriktionsenzym-verdaute Miniprep DNA analysiert. Alle sechs getesteten Klone enthielten das erwartete Plasmid.

Durch Ansequenzierung der Plasmide E1/Sma (gleich B64, Abb. 9) und E2/Sma und Vergleich der Sequenzen mit dem A_{β}^{b} Gen konnte die ß1 Domäne kartiert werden (Abb.5).

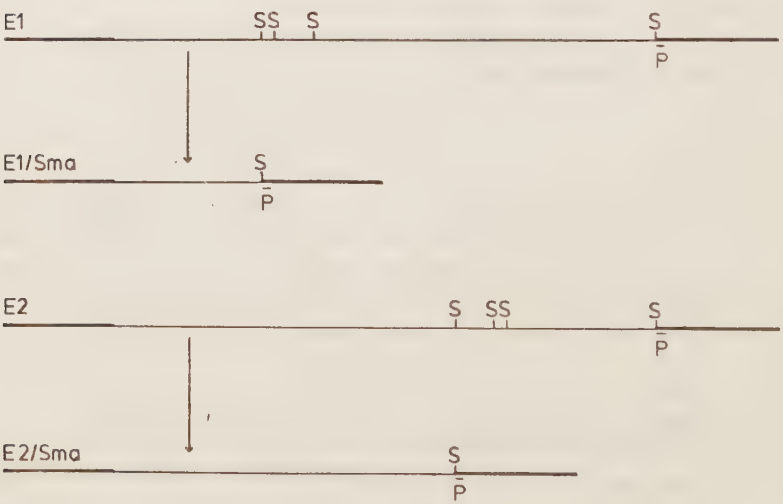
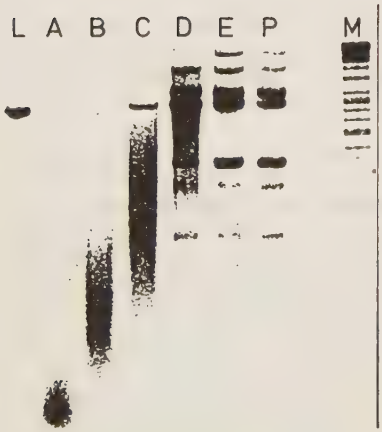


Abb.6 Die Ableitung der Plasmide E1/Sma aus E1 und E2/Sma aus E2.
S bezeichnet die Lage der SmaI Schnittstellen.
Bei P bindet der Sequenzierprimer.

3.7 Deletionssubklone durch DNAseI Behandlung

Da die einzige SalI Schnittstelle in E1 und E2 aus der 'multiple cloning site' von pUC8 stammte, und in beiden Klonen die Bindungsstelle für den Sequenzierprimer wenige Nukleotide 'downstream' der SalI Schnittstelle lag, wurde nach der DNAseI Behandlung ein SalI Linker anligiert und mit SalI die Deletion erzeugt.

Die analytische Titration (2.15) der benötigten DNAseI Menge zeigte hier für E2 mit 30pg (C) den gewünschten Abbau (Abb.7). Bei mehrfacher Durchführung (siehe unten) wurden 10-30pg (D-C) ermittelt.



A-E sind sie getesteten Mengen an DNAseI auf Plasmid E1.
A: 300pg, B: 100pg, C: 30pg, D: 10pg, E: 3pg. P: native Plasmid DNA.
L: Mit Restriktionsenzym linearisiert Plasmid DNA. M: Lambda DNA Marker.

Abb. 7: Titration der Menge an DNAseI

Die erste Deletionssubklonierung von E1 ergab nur wenige Kolonien. Die meisten dieser Kolonien erwiesen sich als ungeeignet. Die Klone B8,B19 und B30 (Abb. 9) wurden sequenziert.

Die Deletionssubklonierung von E2 ergab pro Gelstück (insgesamt 20) mindestens 50 Kolonien. Von den Gelstücken 2-6 wurden je 12-24 Kolonien durch Isolation von Miniprep DNA und folgendem BglI Verdau getestet. Abb.8 zeigt die 12 getesteten Kolonien von Gelstück 5. Kolonie 7 ist eindeutig ein nicht erwarteter Klon. Die Kolonien 1,4,8 sind nicht eindeutig zuzuordnen. Die übrigen Kolonien haben ein Insert von 4,1-4,5kb. Kolonie 10 wurde später als B63 sequenziert. Die Klone B22, B23, B25, B28, B31, B32, B33, B34, B40, B61, B63, B80 stammten aus diesem Versuch.

Eine zweite Deletionssubklonierung von E1 ergab ca. 20 Klone pro Gelstück. Die Klone B36, B37, B38, B39, B67, B58 wurden sequenziert.

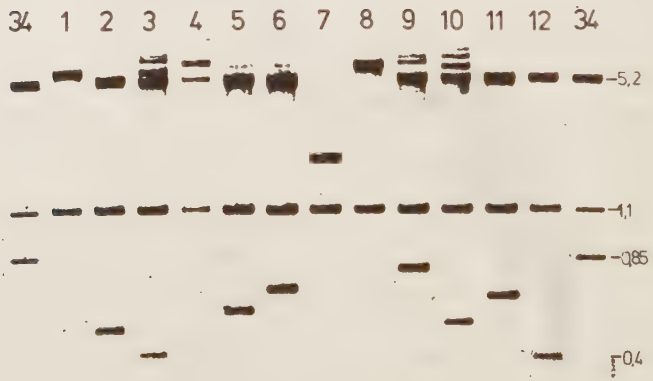


Abb. 8: Deletionssublone
1-12 sind die 12 getesteten Deletionssubklone von Gelstück 5.
34 ist der schon vorher charakterisierte Deletionsklon B34 um die relative Position der übrigen Klone zu bestimmen.
Längenmaßstab in kb.

3.8 DNA Sequenzierung

Geeignete Klone (vergl. 3.7) wurden in 200ml LB-Medium hochgezogen und Plasmid DNA nach 2.4 isoliert. Typischerweise wurden 200-300µg DNA erhalten.

Die Qualität der Plasmid DNA war entscheidend für die Lesbarkeit der Sequenzgele. Eine einmalige Reinigung über $CsCl_2$/EtBr Gradienten war ausreichend. Phenol-,Chloroform- und Etherextraktionen mußten sorgfälltig durchgeführt werden. Schlecht sequenzierbare DNA wurde durch Wiederholung der Extraktionen und Präzipitation nicht wesentlich besser sequenzierbar, sondern mußte noch einmal neu isoliert werden..

Von den getesteten Salz- und DNA-Konzentrationen erwies sich die höhere Konzentration als günstiger (vergl. 2.17). Zwischen dem 15mer und dem 17mer Sequenzierprimer war kein deutlicher Unterschied feststellbar.

Mit dem Nukleotid-Mix 1 (2) war die Sequenz regelmäßig im Bereich 10-150 (80-240) Nukleotide nach dem Primer lesbar. Durch Trocknen der Gele konnten bis zu 380 Nukleotide (Mix2) gelesen werden. Etwa 0,2-0,5% der Nukleotide waren nicht lesbar.

3.9 Die Sequenz von $A_\beta{}^{w2}$

Die Längen und Positionen der einzelnen abgelesenen Sequenzen, die durch Kartierung der Deletionssubklone, durch Homologie zur $A_\beta{}^{b}$ Sequenz und durch überlappende Sequenzen zur $A_\beta{}^{w2}$ Sequenz zusammengefügt worden waren, sind aus Abb.9 ersichtlich.

Das Exon 2 hat 273 Nukleotide bzw. 91 Aminosäuren (Tabelle 1). Das Intron ist 2,4kb lang (Tabelle 2). Das Exon 3 hat 282 Nukleotide bzw. 94 Aminosäuren (Tabelle 3). Aus Tabelle 4 sind die Anzahl der Substitutionen von Nukleotiden und Aminosäuren für die Exon 2 und 3 ersichtlich.

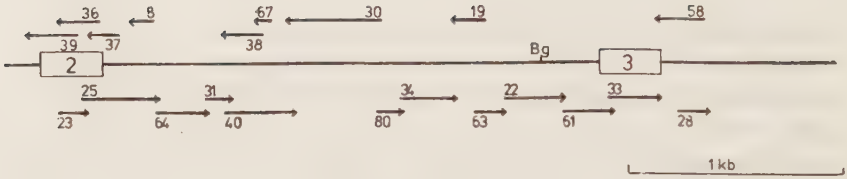
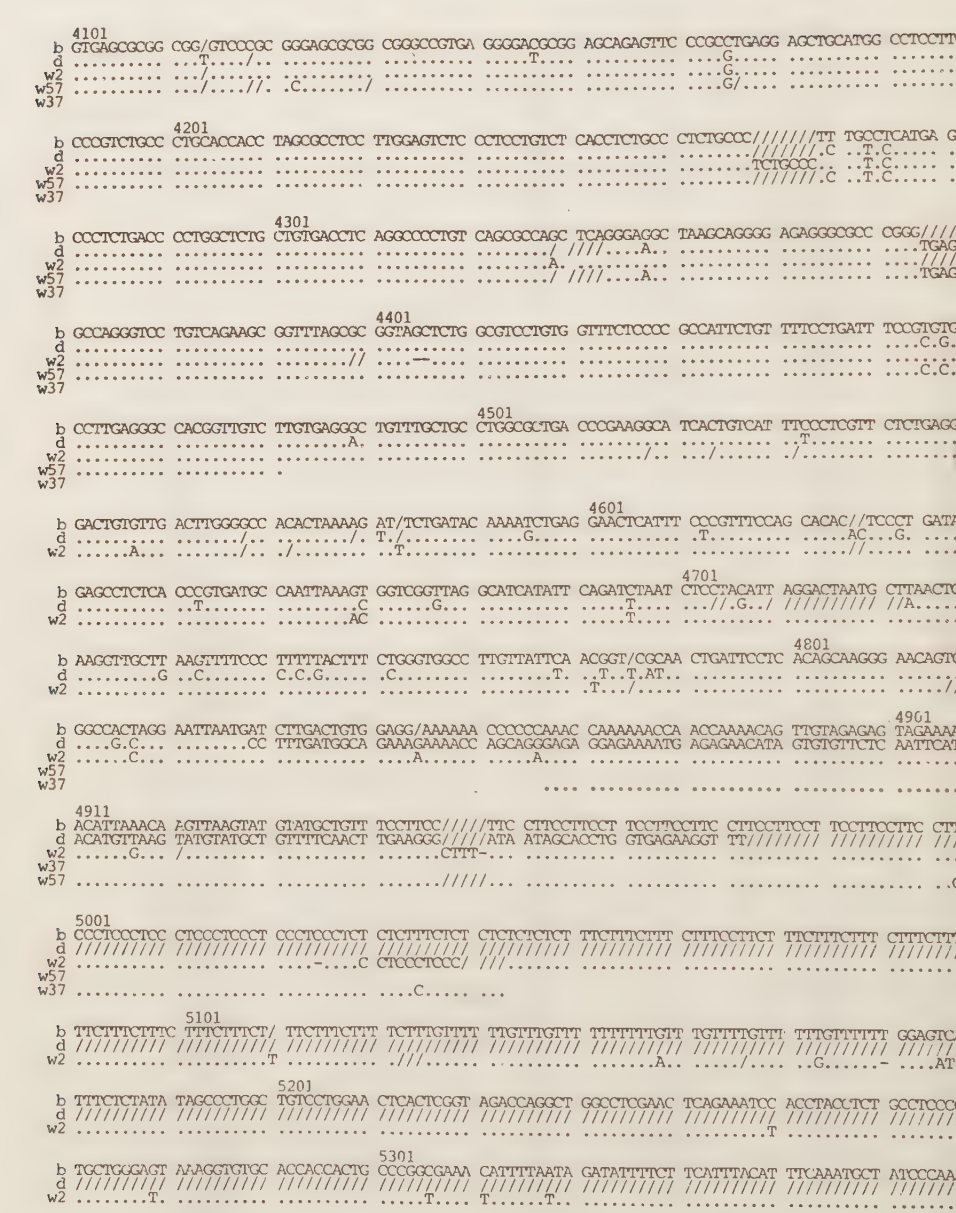


Abb.9 Lage der Deletionssubklone mit jeweils sequenziertem DNA Abschnitt.
Die Pfeile geben Start, Richtung und Länge der Sequenzreaktionen an.
Die Nummern der Deletionssubklone werden im Text als B.. Nummern aufgeführ
Bg ist die Position der BglI Schnittstelle.
2 und 3 bezeichnen die Lage der Exons 2 bzw 3.

Tabelle 1: Nukleotidsequenzen von Exon 2

```
                6                                                
```

Tabelle 2: Nukleotidsequenzen des Introns



e 2: Fortsetzung

mmerierung erfogte wie für das b-Allel, Sequenz von Larhammer et al. (1983).

l: Malissen et al.(1983). w37- und w57- Allel von Budimir (1985).

eiches Nukleotid wie im b-Allel; / : Nukleotid deletiert, - : Nukleotid nicht bestimmbar

abelle 3: Nukleotidsequenzen von Exon 3

```
                                                
```

Tabelle 4: Nukleotid- und Aminosäurensubstitutionen der Exone 2 und 3

Exon 2

	Nukleotide						Aminosäuren					
	d	k	b	w37	w57	w2	d	k	b	w37	w57	w2
d												
k	30						16					
b	13	29					8	15				
w37	27	20	26				16	11	14			
w57	35	26	39	41			20	15	23	22		
w2	31	24	32	32	34		21	18	21	18	26	

Exon 3

	Nukleotide						Aminosäuren					
	d	k	b	w37	w57	w2	d	k	b	w37	w57	w2
d												
k	13						5					
b	10	7					4	1				
w37	9	6	2				4	1	0			
w57	0	13	10	9			0	5	4	4		
w2	11	8	3	3	11		6	3	2	2	6	

4. Diskussion

4.1 Allgemeines

Die genomische Nukleotidsequenz des A_β^{w2} Gens des t-Stammes EDY 589 wurde partiell bestimmt und mit den homologen Sequenzen der Allele A_β^{b}, A_β^{d}, A_β^{k}, A_β^{w57}, A_β^{w37} (Choi et al. 1983, Larhammer et al. 1983, Malissen et al. 1983, Budimir 1985) verglichen (Tabellen 1-4). Die Sequenzen von Exon 2 (ß1 Domäne) und von Exon 3 (ß2 Domäne) sowie die Sequenz des dazwischenliegenden Introns wurden mittels der enzymatischen Kettenabbruchmethode (Sanger et al. 1977) auf geprimter Plasmid DNA erhalten. Die DNA wurde aus Deletionssubklonen, die nach der Methode von Frischauf (Frischauf et al. 1980) hergestellt worden waren, isoliert.

4.2 Strategie der DNA Sequenzierung

Die zur DNA Sequenzierung notwendigen überlappenden Fragmente oder Klone lassen sich auf mehrere Arten gewinnen:

I. durch gezielte Isolation bzw. Subklonierungen von Restriktionsenzymfragmenten;

II. statistisch verteilt ('random sequencing', durch mehrere Methoden, siehe Messing, 1983);

III. durch Deletionssubklonierung. (Bevan und Son 1983, Frischauf et al. 1980, Hong 1982, Misra 1985, Yanisch-Perron 1985).

Hier wurde eine Deletionssubklonierung (nach Frischauf) gewählt, weil die Klone fast genau so schnell wie im 'random sequencing' erhalten werden können, und durch eine Vorauswahl der Klone weniger Sequenzen vielfach bestimmt werden müssen. Außerdem ist keine aufwendige detailierte Restriktionskartierung notwendig.

Obwohl die Sequenzierung nach Sanger mit M13-Phagen DNA gängiger ist, wurde in der vorliegenden Arbeit mit Plasmid DNA sequenziert. (Gou und Wu 1983, Vieira und Messing 1982,

Wallace et al. 1981).

Es konnten etwa 240 Nukleotide pro Klon gelesen werden. Dies entspricht fast der Lesbarkeit von Sequenzen auf M13. Das M13 System erfordert eine zusätzliche Umklonierung, bietet als Vorteil aber eine bedeutend einfachere DNA Präparation. Sequenzierung auf Plasmid DNA ist besonders für schon isolierte DNA geeignet (Vieira und Messing, 1982).

4.3 Die Sequenz A_β^{w2} und Polymorphismus der A_β Allele

Die ermittelte Sequenz des A_β^{w2} Allels weist, wie andere H-2 Klasse II A_β Allele, die folgenden allgemeinen Charakteristika auf: Die AG/GT Splicing Regel wird für Exon 2 und 3 beachtet. Splicing erfolgt zwischen dem ersten und dem zweiten Nukleotid eines Tripletts. Die ß1 und ß2 Domäne haben die Tripletts für Cystein an entsprechender Position.

Da auch innerhalb der Exone von A_β^{w2} keine Verschiebung des Leserasters auftritt, gibt es in Übereinstimmung mit dem serologisch nachgewiesenen A-Antigen (Nizetic et al. 1984) keinen Hinweis darauf, daß A_β^{w2} ein nicht-funktionelles Gen ist.

Das Intron A_β^{w2} hat mit 2,4kb, abgesehen von kleinen Insertionen/Deletionen (Position 4258, 4947, 5028, 5949), die gleiche Länge wie das b Allel und zeigt 97% Sequenzhomologie. Das d Allel zeigt dazu in Position 4101-4320 keinen auffälligen Unterschied, unterscheidet sich aber durch eine Deletion von etwa 870bp deutlich in der Länge und dann mehrfach durch veränderte Sequenzabschnitte. Die partielle Sequenz des w57 Allels, insbesondere der Positionen 4320-4480 und 6201-6407, sowie die Länge des Introns mit 1,5kb (Budimir 1985) sind sehr d-ähnlich (99% Homologie). Das w37 Allel ist b-ähnlich, vor allem durch die Sequenzen 4867-5043, die in A_β^{d} deletiert sind.

Zusammenfassend lassen sich also für das Intron die Gruppe I (mit den Allelen b,w2,w37) und die Gruppe II (mit den

Allelen d,w57) bilden.

Diese Gruppenbildung ist in Übereinstimmung mit den Daten über Restriktionsfragmentlängenpolymophismus (Figueroa et al. 1985) und bestätigt die dort geäußerte Vermutung, daß A_β^{w37} zu zu A_β^{w2} homologer ist, als zu A_β^{w57}.

Für das dritte Exon lassen sich bei insgesamt geringem Polymorphismus (Sequenzhomologien 95-100%) die gleichen Gruppen bilden. Auffällig ist die identische Sequenz des w57 mit dem d Allel. Da der entsprechende Mausstamm CRO 437 (t, K^k, A_β^{w57}, E_α^{bm}) zeitweilig heterozygot mit THF (DBR 7) (T, K^d, A_β^d, E_α^d) (Klein et al. 1983b) gehalten worden war, könnte nach doppelter Rekombination die erhaltene Sequenz von CRO 437 auch von THF stammen. Dies ist wegen der Rekombinationssuppression zwischen t- und nicht-t-Chromosomen sehr unwahrscheinlich.

Die Nukleotidsequenz des k Allels ist, in Übereinstimmung mit Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusdaten, (Golubic 1985) weder Gruppe I noch Gruppe II zuordenbar. Die Aminosäuresequenz würde in Gruppe I fallen.

Insgesamt finden sich bei 18 Positionen Nukleotidsubstitutionen; 11 davon betreffen das 3. Nukleotid eines Tripletts und nur bei 6 Positionen ist eine Substitution der Aminosäure vorhanden. Diese Daten deuten auf eine Selektion gegen Polymorphismus auf Proteinebene hin.

Das Exon 2 zeigt mit 85-95% Nukleotidhomologie einen stärkeren Polymorphismus als die bisher diskutierten Sequenzabschnitte.

Die größte Ähnlichkeit zeigen das b- und d-Allel zueinander. Wenn man die Anzahl der Nukleotid- und Aminosäuresubstitutionen des gesamten Exons in Betracht zieht, lassen sich keine eindeutigen Verwandtschaftbeziehungen ableiten; es lassen sich im Gegensatz zum Exon 3 und Intron keine Gruppen von Allelen bilden.

Bemerkenswert ist auch, daß die t-Allele (w2,w37,w57) untereinander nicht homologer sind, als zu den Allelen der

Laborstämme (b,d,k). Weitere Untersuchungen müssen zeigen, ob diese Laborstämme in ihrem Nukleotidpolymorphismus repräsentativ sind, oder ob sie auf Grund ihrer Etablierung aus einer limitierten Mauspopulation (vergl. Klein 1975) einen zu geringen Grad an Polymorphismus widergeben.

In Übereinstimmung mit den Proteindaten finden sich Bereiche erhöhter Variabilität; hier bei den Positionen 12-15, 62-67 und 85-89.

Auffällig ist hierbei daß in jedem dieser Abschnitte in den verschieden Allelen immer wieder die gleichen Sequenzen auftreten.

Besonders charakteristisch sind die Positionen 65-68. Das k,w2 und w57 Allel haben dieselbe Deletion von zwei Aminosäuren und dieselbe Substitution. In Position 62/63 sind einerseits k,w2,w57 und w37 und andererseits b und d und identisch.

Auch Abschnitt 12-15 hat identische Sequenzen: hier sind es k und w37, die sich von den übrigen, die untereinander wiederum ähnlich sind, deutlich unterscheiden.

Eine analoge Situation, allerdings mit differierender Gruppenbildung, findet sich bei 85-89: b und w2 sind identisch, die übrigen sind mehr oder weniger ähnlich zueinander.

Damit stellt sich die Frage, wie ein derartiges Muster zu interpretieren ist:

Die Wahrscheinlichkeit, daß sich immer wieder die gleichen Sequenzabschnitte unabhängig voneinander nur durch Punktmutationen gebildet haben, ist gering.

Auch die Möglichkeit, daß nur bestimmte Aminosäure oder Aminiosäurekombinationen für jeden dieser Abschnitte zulässig sind, und damit der Selektionsdruck immer wieder zu den ermittelten Sequenzen führt, ist unwahrscheinlich, da dann die Degeneration des genetischen Codes sichtbar sein müsste. Nur in Position 62 findet sich eine stumme Mutation. Bei 64 verschieden Nukleotiden finden Substitu-

tionen, von denen nur 14 das 3. Nukleotids eines Tripletts betreffen. Eine Selektion gegen Polymorphismus auf Proteinebene wie in Exon 3 ist hier nicht vorhanden.

Mehrfache Rekombinationen innerhalb von Exon 2 könnten das Muster der Gruppierungen erklären. Da die Rekombinationshäufigkeit von t (w2,w57,w37)- mit nicht-t (b,d,k)-Chromosomen stark vermindert ist, und auch die t- Allele für sich genommen keine Gruppe bilden, kann dann angenommen werden, daß Rekombinationen zwischen den t-Chromosomen, die nicht supprimiert sind, stattfanden. Die räumliche Trennung (Ägypten und Orkney-Inseln) der hier verglichenen Wildmauspopulationen würde gegen solche Rekombinationsereignisse sprechen. Unter der Annahme, daß die t-Chromosomen gemeinsamen Ursprungs sind (vergl. Figueroa et al. 1985, Röhme et al. 1984), könnten die geforderten Rekombinationen stattgefunden haben. Zusätzlich müsste gefordert werden, daß keine weiteren Mechanismen wie Punktmutationen die Allele in kurzer Zeit verändern.

Neben Punktmutationen und Rekombinationen wurde von mehreren Autoren eine asymetrische, nicht reziproke 'copy substitution' (meistens Genkonversion genannt) als weiterer Mechanismus angenommen. Nicht reziproke Sequenzübertragung wird bei E.coli (Kornberg 1980, Seite 618) und Hefen (Klein, H.L. 1984) beschrieben. Ob dieser ober ähnliche Mechanismen auch bei MHC Genen vorliegen, ist umstritten (Klein, J. 1984, Pease 1985).

Möglicherweise entstand der Polymorphismus von Exon 2 durch eine Kombination der diskutierten Mechanismen. Die Sequenzdaten der A_{β} Allele für sich genommen, können darauf keine Antwort geben.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß die Nukleotidsequenzen des A_{β} Gens in Exon 3 und Intron in Übereinstimmung mit den Daten über Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus sind und zusätzlich eine nähere Verwandtschaft der w2 und w37 Allele zeigen. Die Sequenzen von Exon 2 bieten mit ihrem komplexen Muster mehrere Interpre-

tationsmöglichkeiten. Auffällig ist hier besonders die identische Deletion von zwei Aminosäuren in den Allelen k,w2 und w57.

Von Klein (1986b) wurde unter Berücksichtigung weiterer Loci (D, C4, E_{α}, K) ein Stammbaum für die t-Chromosomen vorgeschlagen, ohne daß Genkonversion angenommen werden muß.

5. Zusammenfassung

Aus dem Cosmidklon 2.1 einer genomischen Bibliothek des t-Stammes EDY 589 wurden durch Subklonierung und Deletionssubklonierung mit darauffolgender DNA Sequenzierung nach Sanger auf Plasmid DNA 3kb des A_β^{w2} Gens (Exon 2, Exon 3 und das dazwischenliegende Intron) bestimmt.

Die Nukleotidsequenzen von Exon 3 und des Introns der A_β Allele bilden nach Struktur- und Sequenzhomologie zwei Gruppen:

I: b, w2 (EDY 589), w37 (CRO 435)
II: d, w57 (CRO 437)

In Exon 3 wird gegen Proteinpolymorphismus selektioniert.

Für die Gesamtheit von Exons 2 lassen sich keine Gruppen bilden. Teilsequenzen zeigen in jeweils anderen Kombinationen auffällige Homologien.

Die Sequenzdaten von Exons 3 und des Introns sind mit den durch Serologie und Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus angenommenen Verwandtschaftbeziehungen der t-Chromosomen zu vereinbaren und zeigen darüber hinaus eine größere Verwandtschaft von A_β^{w37} zu A_β^{w2} als zu A_β^{w57}.

Aus den Sequenzendaten des gesamten Exon 2 lassen sich ohne Zuhilfenahme weiterer Daten keine eindeutigen Verwandtschaftbeziehungen der Allele aufstellen. Auffällig ist eine identische Deletion von zwei Aminosäuren im k, w2 und w57 Allel.

Mehrere Mechanismen, die zur Interpretation des Polymorphismus von Exon 2 herangezogen werden können, werden diskutiert.

Auf Grund des nicht einheitlichen Bildes von Exon 3 und Intron einerseits, sowie von Exon 2 andererseits müssen für eine Genealogie von t-Chromosomen weitere Genloci berücksichtigt werden.

6. LITERATUR

Arzt, K., Shin, HS. and Bennett, D. (1982) Gene mapping within the T/t complex of the mouse. II. Anomalous Position of the H-2 complex in t haplotypes. Cell 28:471-476

Barnes, W.M., Bevan, M. and Son, P.H. (1983) Kilo Sequencing: Creation of an Ordered Nest of asymetric Deletions across a Large Target Sequence Carried on Phage M13. In: Methods of Enzymology, Vol. 101, Ed.: Wu, R., Grosman, L., Moldave, K., Academic Press, New York

Bennett, D. (1975) The T-locus of the mouse. Cell 6:441-454

Birnboim, H.C. (1983) A Rapid Alkaline Extraction Method for the Isolation of Plasmid DNA. In : Methods in Enzymology, Vol. 100, Ed.: Wu, R., Grossman, L., Moldave, K., Academic Press, New York

Bryson, V. (1944) Spermatogenesis and fertility in Mus musculus is affected by factors at the T locus. J. Morph. 74:131-187

Budimir, O. (1985) Persönliche Mitteilung.

Casadaban, M. J. and Cohen, S. N. (1980) Analysis of gene control segments by DNA fusion and cloning in Escherichia coli. J. Mol. Biol., 138:179-207

Chesley, P. and Dunn, L.C. (1936) The inheritance of taillesness (anury) in the house mouse. Genetics 21:525-536

Choi, E., McIntry, K., Germain, R.N. and Seidman, J.G. (1983) Murine I-A_β Chain Polymorphism: Nucleotide Sequences of Three Allelic I-A_β Genes. Science 221:283-286

Dausset, J. (1958) Iso-leuco-anticorps. Acta Haematol. (Basel) 20:156-166

Davis, M.M., Cohe, D.I., Nielsen, E.A., Steinmetz, M., Paul, W.E. and Hood, L. (1984) Cell-type-specific cDNA probes and the murine I region: The localization and orientation of A_α^d. Proc. Natl.Acad. Sci (USA) 81:2194-2198

Dembic, Z., Singer, P. and Klein, J. (1985) Eo: A history of a mutation. EMBO J. 3:1647-1654

Dobrovolskaia-Zavadskaia and N., Kobozieff,N. (1932) Les souris anoures et la queue filiforme qui se reproduisent

entre elles sans disjunction. C.R. Soc. Biol. 110:782-784

Figueroa, F., Golubic, M., Nizetic, D. and Klein, J. (1985) Evolution of mouse major histocompatibility complex genes borne by t chromosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:2819-2823

Frischauf, A., Garoff, H. and Lehrach,H. (1980) A subcloning strategy for DNA sequence analysis. Nuc. Acid. Res. 8:5541-5549

Frischauf, A. (1985) The T/t complex of the mouse. Trends in Genetics, 4:100-103

Golubic, M. (1985) Persönliche Mitteilung.

Golubic, M., Figueroa, F., Tosi, M. and Klein, J (1985) Restriction fragment lenth polymorphism of C4 genes in mice with t chromosomes. Immunogenetics 21:247-256

Gorer, P.A. (1936a) The detection of a hererditary antigenic difference in the blood of mice by means of human goup A serum. J. Genetics 32:17-31

Gorer, P.A. (1936b) The detection of antigenic differences in Mouse erythrocytes by the employment of immune sera. Brit. J. Exp. Pathol. 17:42-50

Gorer, P.A. (1937) The antigenic basis of tumor transplantation. J. Pathol. Bacteriol. 44:691-697

Gorer, P.A., Lyman,S. and Snell, G.D. (1948) Studies on the genetic and antigenic basis of tumor transplantation; linkage between a histocompatibility gene and 'fused' in mice. Proc. Roy. Soc. (London)B 135:499-505

Grosveld, F.G., Lund, T., Murray, E.J., Mellor, A.L., Dahl H.H.M. and Flavell, R.A. (1982) The construction of cosmid libraries which can be used to transform eucaryotic cells. Nuc. Acid Res. 10:6715-6732

Guo, L. and Wu, R. (1983) Exonuclease III: Use for DNA Sequence Analysis and in Specific Deletions of Nucleotides. In: Methods in Enzymology, Vol. 100, Ed.: Wu, R., Grossman, L., Moldave, K., Academic Press, New York

Hammerberg, C. and Klein, J. (1975) Linkage disequilibrium between H2 and t complex in chromosome 17 of the mouse. Nature 258:296

Hong, G.F. (1982) A Systematic DNA Sequencing Strategy.

J. Mol. Biol., 158:539-549

Hood, L., Steinmetz, M. and Malissen, B. (1983) Genes of the major histocompatibility complex of the mouse. In: Ann. Rev. Immunol. Vol 1, Ed.: Paul, W.E., Fathman, C.G., Metzger, H., Annual Reviews Inc., Palo Alto.

Hood, L., Kronenberg, M. and Hunkapillar, T. (1985) T cell antigen receptors and the immunoglobulin supergene family. Cell, 40:225-229

Klein, H.L. (1984) Lack of associoation between intra-chromosomal gene conversion and reciprocal exchange. Nature 310:748-753

Klein, J. (1975) Biology of the Mouse Histo-compatibility-2 Complex. Springer, New York

Klein, J. (1982) Immunology: The science of self-nonself dicrimination. Wiley and Sons, New York

Klein, J. (1984) Gene conversion in MHC genes. Transplantation 38:327-329

Klein, J. (1986a) Natural history of the major histo-compatibility complex. Wiley and Sons, New York

Klein, J. (1986b) Publikation in Vorbereitung

Klein, J. and Figueroa, F. (1981) Polymorphism of the H-2. Immunol. Rev. 60:23-57

Klein,J., Juretic,A., Baxevanis, C.N. and Nagy, Z.A. (1981) The traditional and new version of the mouse H-2 complex. Nature 291:455-460

Klein, J., Figueroa, F. and Nagy, Z. (1983a) Genetics of the major histocompatibility complex: the final act. In: Ann. Rev. Immunol Vol 1. Ed.: Paul, W.E., Fathman, C.G., Metzger, H., Annual Reviews Inc., Palo Alto.

Klein, J., Figueroa, F. and David, C.S. (1983b) H-2 Haplo-types, Genes and Antigens: Second Listing. II. The H-2 complex. Immunogenetics 17:553-596

Klein, J., Sipos, P. and Figueroa, F., (1984) Polymorphism of t complex genes in European wild mice. Genet.Res. (Camb.) 44:39-46

Kornberg, A. (1980) DNA Replication. W.H. Freeman, San Fransisco

Kronenberg, M., Siu, G., Hood. L.E. and Shastri, N. (1986)

The molecular genetics of the T-cell antigen receptor and T-cell antigen recognition. In: Ann. Rev. Immunol Vol 4. Ed.: Paul, W.E., Fathman, C.G., Metzger, H., Annual Reviews Inc., Palo Alto..

Larhammar, D., Hammerling, U., Denaro, M., Lund, T., Flavell, R.A., Rask,.L. and Peterson, P.A. (1983) Structure of the Murine Immune Response I-A_β Locus: Sequence of the I-A_β gene and an Adjecent ß-Chain Second Domain Exon. Cell, 34:179-188

Malissen, M., Hunkapiller, T. and Hood, L. (1983) Nucleotide Sequence of a Light Chain Gene of the Mouse I-A subregion: A_β^d. Science, 221:750-754

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J. (1982) Molecular cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N. Y.

McDevitt, H.O., Deak, B.D., Schreffler,D.C. and Klein, J., Stimpfling, J.H., Snell, G.D. (1972) Genetic control of the immune response. Mapping of the Ir-1 locus. J.Exp.Med. 135:1259-1278

Medawar, P.B. (1944) The behavior and fate of skin autografts and skin homografts in rabbits.J. Anat. 78:176-199

Messing, J. (1983) New M13 Vectors for Cloning. In: Methods in Enzymology, Vol. 101, Ed.: Wu, R., Grossman, L., Moldave, K., Academic Press, New York

Misra, T.K. (1985) A new stratedy to create ordered deletions for rapid nucleotide sequencing. Gene, 34:263-268

Nizetic, D., Figueroa, F. and Klein, J. (1984) Evolutionary relationship between the t and H-2 haplotypes in the mouse. Immunogenetics 19:311-320

Pease, L.R. (1985) Diversity in H-2 genes encoding antigen-presenting molecules is generated by interactins between members of the major histocompatibility complex gene family. Transplantation 39:227-231

Riede, I. (1985) persönliche Mitteilung

Rogers, J.H. and Willison, K.R. (1983) A major rearrangement in the H-2 complex of mouse t haplotypes. Nature 304:549-552

Rigby, P. W. J., Dieckmann, M., Rhodes, C. and Berg, P.

(1977) Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. J. Mol. Biol., 113:237-251

Röhme, D., Fox, H., Herrmann, B., Frischauf, A-M., Edstrom, J-E., Mains, P., Silver, L.M. and Lehrach, H. (1984) Molecular clones of the mouse t complex derived from micro dissected metaphase chromosomes. Cell 36:783-789

Sandler, L. and Golic, K. (1985) Segregation distorsion in Drosophila. Trends Genet 1:181-185

Sanger, F. and Coulson, A.R. (1975) A Rapid Method for Determining Sequences in DNA by Primed Synthesis with DNA Polymerase. J.Mol Biol. 94:441

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. Proc. Nat. Acad. Sci. (USA) 74:5463-5467

Silver, L.M. and Artzt, K. (1981) Recombination suppression of mouse t-haplotypes due to chromatin mismatching. Nature 290:68-70

Smith, A.J.H. (1980) DNA Sequence Analysis by Primed Synthesis. In: Methods of Enzymology, Vol. 65, Ed.: Grossman, L., Moldave, K. Academic Press, New York

Snell, G.D. (1948) Methods for the study of histo-compatibility genes. J. Genetics 49:87-108

Staden, R. (1977) Sequence data handling by computer. Nuc. Acid. Res. 4:4037

Steinmetz, M., Minard, K., Horvath, S., McNicholas, J., Frelinger, J., Wake, C., Long, E., Mach, B. and Hood, L. (1982) A molecular map of the immune response region from the major histocompatibility complex of the mouse. Nature 300:35-43

Strauss, E.C., Kobori, J.A., Siu, G. and Hood, L.E. (1985) Specific Primer Directed DNA Sequencing. Publikation in Vorbereitung.

Sturm, S., Figueroa, F. and Klein, J. (1982) The relationship between t and H-2 complex in wild mice. I. The H-2 haplotypes of 20 t-bearing straines. Genet. Res (Camb.) 40:73-88

Southern, E. (1975) Detection of specific sequences among

DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:503

Vieira, J. and Messing, J., (1982) The pUC plasmids, an M13mp7 derived system for insertion muagenesis and sequencing with synthetic universal primers. Gene, 19:259-268

Wallace, R.B., Johnson, M.J., Suggs, S.V., Miyoshi, K., Bhatt, R. and Itakura, K. (1981) A set of synthetic oligodeoxyribonucleotide primers for DNA sequencing in the plasmid vector pBR322. Gene 16:21-26

Widera, G. and Flavell, R.A. (1985) The I region of the C57BL/10 mouse: Characterization and physical linkage to H-2K of an SBß-like class II pseudogene, $\Psi A_{\beta}3$. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:5500

Willison, K.R., Dudley, K. and Potter, J. (1986) Molecular cloning and sequence analysis of a haploid expressed gene encoding t complex polypeptide 1. Publikation in Vorbereitung.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J. (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUc19 vectors. Gene 33:103-109

Zinkernagel, R. M. and Doherty, D. C. (1974) Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngenic or semiallogeneic system. Nature 248:701-702

Lebenslauf:

Ralf Schöpfer

geboren am	30. August 1956 in Stuttgart
1963 - 1966	Grundschule in Korb im Remstal
1966 - 1968	Staufer-Gymnasium Waiblingen
1968 - 1975	Salier-Gymnasium Waiblingen Abschluß Abitur
1976	Immatrikulation im Studiengang Humanmedizin an der Universität Tübingen
1978/79	Auslandsstudium an der 'Faculte Medicine, Nice' (Frankreich)
1981	Auslandsstudium an der 'Universite II, Bordeaux' (Frankreich)
1982	Staatsexamen Medizin, mündliche Prüfung des dritten Teils der ärztlichen Prüfung am 13. Oktober 1982
1983	Assistenzarzt in Dax (Frankreich)
1985	Erstellung der vorliegenden Promotionsarbeit
1978 - 1986	Diplomstudiengang Biochemie in Tübingen